

⑫ 公開特許公報 (A) 平2-288899

⑬ Int. Cl.
C 07 K 15/12
// A 61 K 37/02識別記号
ACS序内整理番号
8619-4H
8615-4C

⑭ 公開 平成2年(1990)11月28日

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全18頁)

⑮ 発明の名称 成熟肝実質細胞増殖因子 (I)

⑯ 特 願 平1-320548

⑯ 出 願 平1(1989)12月12日

優先権主張 ⑯ 昭63(1988)12月12日 ⑯ 日本 (JP) ⑯ 特願 昭63-311866

⑰ 発明者 中村 敏一 福岡県福岡市東区みどりヶ丘3丁目11-6

⑰ 出願人 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

⑰ 代理人 弁理士 平木 祐輔 外1名

明細書

(i) 次表のアミノ酸組成 (モル比±10%)

| アミノ酸 | α 構 | β 構 |
|------|------|------|
| Cys | 36.5 | 8.9 |
| Asp | 81.4 | 23.1 |
| Thr | 34.3 | 13.0 |
| Ser | 34.9 | 18.2 |
| Glu | 56.8 | 23.2 |
| Gly | 46.2 | 41.1 |
| Ala | 15.3 | 19.3 |
| Val | 16.8 | 15.1 |
| Met | 8.9 | 3.9 |
| Ile | 17.6 | 15.2 |
| Leu | 19.8 | 29.5 |
| Tyr | 23.3 | 13.0 |
| Phe | 18.0 | 4.0 |
| Lys | 48.6 | 24.0 |
| His | 17.9 | 9.8 |
| Arg | 33.7 | 17.8 |

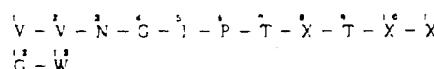
1. 発明の名称

成熟肝実質細胞増殖因子 (I)

2. 特許請求の範囲

1. 二種のサブユニットからなり、かつ、下記の理化学的性質を有するポリペプチドからなる成熟肝実質細胞増殖因子 (I)。

(i) β 構の N 末端アミノ酸配列



(式中、Vはバリン、Nはアスパラギン、Gはグリシン、Tはイソロイシン、Pはプロリン、Tはトレオニン、Wはトリプトファン、Xは任意のアミノ酸を示す。)

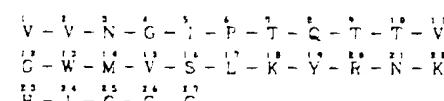
(ii) 遺伝子 SDS-PAGE による推定分子量

α 構 60,000±3,000

β 構 32,000±3,000

2. ポリペプチドが下記の理化学的性質を有する請求項1記載のラット血小板由來の成熟肝実質細胞増殖因子 (I)。

(ii) N 末端アミノ酸配列



(式中、Vはバリン、Nはアスパラギン、Gはグリシン、Tはイソロイシン、Pはプロリン、Tはトレオニン、Qはグルタミン、Wはトリプトファン)

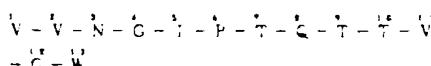
トファン、Mはメチオニン、Sはセリン、Cはロイシン、Pはリジン、Yはチロシン、Rはアルギニン、Hはヒスチジン、Dはシスティンを示す。)

(i) 遊元下 SDS-PAGEによる推定分子量

| | |
|-----|--------------|
| α 級 | 60,000±3,000 |
| β 級 | 32,000±3,000 |

3. ポリペプチドが下記の理化学的性質を有する
請求項1記載のラット肝細胞由来の成熟肝実質
細胞増殖因子(1)。

(i) β 級のN末端アミノ酸配列



(式中、Vはバリン、Nはアスパラギン、Gはグリシン、Iはイソロイシン、Pはプロリン、Tはトレオニン、Cはグルタミン、Wはトリプトファンを示す。)

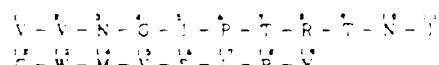
(ii) 遊元下 SDS-PAGEによる推定分子量

| | |
|-----|--------------|
| α 級 | 60,000±3,000 |
| β 級 | 32,000±3,000 |

3

4. ポリペプチドが下記の理化学的性質を有する
請求項1記載のヒ・豚臍由来の成熟肝実質細胞
増殖因子(1)。

(i) β 級のN末端アミノ酸配列



(式中、Vはバリン、Nはアスパラギン、Gはグリシン、Iはイソロイシン、Pはプロリン、Tはトレオニン、Rはアルギニン、Wはトリプトファン、Mはメチオニン、Sはセリン、Cはロイシン、Yはチロシンを示す。)

(ii) 遊元下 SDS-PAGEによる推定分子量

| | |
|-----|--------------|
| α 級 | 60,000±3,000 |
| β 級 | 32,000±3,000 |

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は成熟肝実質細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)、詳しくは成熟肝実質細胞を生体外(*in vitro*)で培養でき、これにより該細胞の維持、増殖を可能とする新しい生理活性

4

を有するタンパク質に関するものである。本発明の成熟肝実質細胞増殖因子は肝再生促進薬、抗慢性肝炎薬、肝硬変への移行防止薬としての使用ができる。

〔従来の技術〕

肝臍は多種多様な機能を有し、生体の恒常性維持に欠くべからざる重要な役割を果たしている。肝臍の主な機能として血漿タンパク質の合成分泌、糖新生やグリコーゲン代謝による血糖調節、尿素合成、胆汁分泌、解毒などがある。また該肝臍の機能は、肝臍を構成する該実質細胞が夫々担っていることが知られている。しかもに生体内(*in vivo*)において、肝臍は各種のオルモントをはじめとする極めて複雑な環境下におかれしており、これを構成する上記成熟肝実質細胞の機能などの研究は甚だ困難である。従って本発明者は、上記成熟肝実質細胞を、生体内と同等の機能を維持した状態で、单纯な生体外の系で再現することができれば、上記した肝機能の研究、あるいは種々のホルモン類薬物などの成熟肝実質細胞に対する作用等

の研究に極めて有用であるとの観点から、上記成熟肝実質細胞を安定に維持培養できる体外培養系の確立を目的として既往研究を重ねてきた。成熟肝実質細胞は、各種の株細胞が活発に増殖する哺乳動物血清の存在下でも全く増殖が認められず、通常約1週間で脱落が起り、その生体外での長期培養が不可能であった。本発明者は、血清に含まれる特定のタンパク質成分の存在下において、成熟肝実質細胞が極めて良好に増殖し、離代培養を行いうることを見出し、該特定の血清成分の分離に成功した(Biochem. Biophys. Res. Commun., 122 (No.3), 1450~1455, 1984)。更に本発明者は、哺乳類動物の血小板のトリロンビン刺激上清液より特定のタンパク質性の成熟肝実質細胞増殖因子(HGF)を単離することに成功し、これが生体外において成熟肝実質細胞増殖活性を有することを見出し、この知見を先に公表した(PBLS LETTER, 224 (No.2), 311~316, 1987)。

〔発明が解決しようとする課題〕

本発明者は、引き続き既往研究を重ねた結果、

5

5

哺乳動物の血小板や白血球などの血球細胞や肝臓、腎臓、肺臓、胎盤、脳、脾臓などの生体組織やモノクローナル抗体中にても、成熟肝細胞を生体外にかけて極めて良好に増殖される活性を有する物質が存在することを見出した。該物質を精製、半壊すべく種々検討を行ったところ、上記生体組織中に含まれる成熟肝細胞増殖因子 (HGF) と略す) には α 領と β 領とを名付けた 2 種のサブユニットからなる 2 本鎖型成熟肝細胞増殖因子 (HGF(1) と略す) と 1 本鎖型成熟肝細胞増殖因子 (HGF(2) と略す) の 2 種類が存在することを見出した。これら 2 種の HGF を分離し、それぞれの生物学的及び化学的物性を明らかにすることが期待された。

(課題を解決するための手段)

すなわち本発明は、成熟肝実質細胞を生体外で増殖させる活性を有する熱及び酸処理に不安定なタンパク質で、2 種のサブユニットからなり、かつ、下記の理化学的性質を有するポリペプチドからなる HGF(1) に係る。

(i) β 領の N 末端アミノ酸配列

7

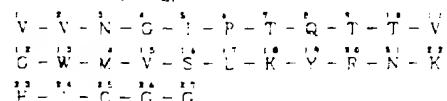
8

(i) 次表のアミノ酸組成 (モル比 $\pm 10\%$)

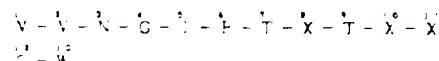
| アミノ酸 | α 領 | β 領 |
|------|------------|-----------|
| Cys | 38.5 | 8.9 |
| Asp | 81.4 | 23.1 |
| Thr | 34.3 | 13.0 |
| Ser | 34.9 | 18.2 |
| Glu | 56.8 | 23.2 |
| Gly | 46.2 | 41.1 |
| Ala | 15.3 | 19.3 |
| Val | 16.8 | 15.1 |
| Met | 8.9 | 3.9 |
| Ile | 17.6 | 15.2 |
| Leu | 19.8 | 29.5 |
| Tyr | 23.3 | 13.0 |
| Phe | 16.0 | 4.0 |
| Lys | 48.6 | 24.0 |
| His | 17.9 | 9.8 |
| Arg | 33.7 | 17.6 |

(ii) N 末端アミノ酸配列

β 領



(式中、V はバリン、N はアスパラギン、G はグリシン、I はイソロイシン、P はプロリン、T はトレオニン、Q はグルタミン、W はトリプトファン、M はメチオニン、S はセリン、L は



(式中、V はバリン、N はアスパラギン、G はグリシン、I はイソロイシン、P はプロリン、T はトレオニン、W はトリプトファン、X は任意のアミノ酸を示す。)

(ii) 遠元下 SDS-PAGE による推定分子量

α 領 $60,000 \pm 3,000$

β 領 $32,000 \pm 3,000$

そして、具体的な HGF(1) として、下記の理化学的性質を有するラット血小板由来の HGF(1)

(本質以下余白)

ロイシン、K はリジン、Y はチロシン、R はアルギニン、H はヒスチジン、C はシスティンを示す。)

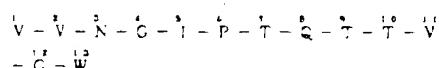
(iii) 遠元下 SDS-PAGE による推定分子量

α 領 $60,000 \pm 3,000$

β 領 $32,000 \pm 3,000$

下記の理化学的性質を有するラット肝細胞由来の HGF(1)、

(i) β 領の N 末端アミノ酸配列



(式中、V はバリン、N はアスパラギン、G はグリシン、I はイソロイシン、P はプロリン、T はトレオニン、Q はグルタミン、W はトリプトファンを示す。)

(ii) 遠元下 SDS-PAGE による推定分子量

α 領 $60,000 \pm 3,000$

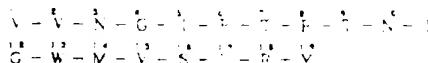
β 領 $32,000 \pm 3,000$

及び下記の理化学的性質を有するヒト胎盤由来の HGF(1)

9

10

(i) 5 様の N 末端アミノ酸配列



(式中、Vはバリン、Wはアラバジン、Nはグリシン、Tはイソロイシン、Sはグロシン、Cはトレオニン、Rはアルギニン、Pは・リグ・ファン、Mはメチオニン、Yはセチン、Hはチロシン、Vはチロシンを示す。)

(ii) 選元下 SDS-PAGE による推定分子量

| | |
|-----|----------------|
| α 様 | 50,000 ± 3,000 |
| B 様 | 32,000 ± 3,000 |

が挙げられる。

HGF の従来の調製方法は、血小板のトロンビン剤上清液を出発物質として、陽イオン交換クロマトグラフィー→ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー→逆相クロマトグラフィー系列での精製によるものであった。FEBS LETTER, 224 (No. 2), 311~316, 1987 参照のこと。

上記方法により得た HGF は SDS-PAGE (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動) で

1-1

得 (第 1 図)、B 様の N 末端アミノ酸配列を決定、そのエイコサペプチド合成分に対する抗体カラムを精製手段として用いることにより HGF (I) を単離した。本発明は、初めて均質な HGF (I) をえたるものである。本発明者は、HGF (I) A 様 N 末端 20 個のペプチドを合成、そのオリクローナル抗体、更には抗体カラムを作成した。本発明者は、血小板のホモジネートを破壊後カラム交換クロマトグラフィー、ついで上述の抗体アフィニティーコロマトグラフィーにかけ、均質な HGF (I) を調製することに成功した。更に本発明者は、HGF の臟器分布を検索したところ、白血球などの血球細胞や肝臓、肺臓、腎臓、脾臓、脳、胎盤など広く生体組織に HGF が含まれていることを見出した。これらの生体組織のホモジネートからイオン交換クロマトグラフィー、色素アフィニティーコロマトグラフィー、レクチンアフィニティーコロマトグラフィー、ヘパリンアフィニティーコロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどを組合せた方法で精製し、SDS-

約 80KD の位置に単一のバンドとして移動し、又選元化 SDS-PAGE では 69KD と約 34KD の 2 本のバンドとして移動することにより、2 種のサブユニットよりなる物質と考えられてきた。本発明者は、血小板のホモジネートを破壊後、陽イオン交換クロマトグラフィー、ヘパリンアフィニティーコロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーで精製することによりあらたに HGF を得た。本発明者は該方法で得た HGF が SDS-PAGE で約 80KD の位置に単一のバンドとして移動し、選元化 SDS-PAGE では約 90KD 及び約 60KD、約 32KD の 3 本のバンドとして移動することを確認した。すなわち該 HGF は分子量約 6 万の 2 本様 HGF (HGF (I)) と 1 本様 HGF (HGF (II)) の 2 成分よりなることをあらたに見出したのである。

本発明者は更に、該 HGF を選元アルキル化して逆相 HPLC にかけ電気泳動的に均一な HGF (I) の 2 種のサブユニット (分子量約 60KD の A 様ペプチドと分子量約 32KD の B 様ペプチド) 脱分

1-2

PAGE で約 80KD の単一バンドを示す HGF を得た。この HGF は選元条件下の SDS-PAGE で、血小板ホモジネートから精製した場合と同様、約 90KD、約 60KD と約 32KD の 3 本のバンドとして移動した。即ち、血小板をはじめとする種々の生体組織ホモジネートに由来する HGF は 2 本様型 HGF (I) と 1 本様型 HGF (II) の 2 成分よりなることを見出したのである。

本発明者は HGF (I) をより簡便に単離する方法を更に検討したところ、疎水性クロマトグラフィーの一環であるフェニル SPC 高速液体クロマトグラフィーにより、均質な HGF (I) を得ることに成功し、本発明を完成させるに至った。

本発明の HGF (I) は、外科手術による部分肝摘出後の肝再生促進薬ならびに急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変への移行、劇症肝炎などの肝疾患の治療薬として、また上記各疾患の診断薬として有用である。更に該 HGF (I) の利用により、ヒトをはじめとして各種動物由来の成熟肝実質細胞を、該 HGF (I) 存在下に生体外で極めて容易に増殖、

1-3

—1832—

1-4

薦めすることが出来、かくして増殖能持される成熟肝実質細胞は、例えば肝機能などの基礎的研究用に、また、各種ホルモン若しくは薬剤等の成熟肝実質細胞に対する作用の研究用に、肝疾患などのスクリーニング試験用に、更に発癌試験用及び肝炎ウイルスの生体外培養における宿主細胞としても極めて有用である。本発明は、かかる有用な生理活性物質を提供するものである。

以下、本発明の HGF (1) の製造方法につき詳述する。本発明 HGF (1) は、例えば哺乳動物の血小板等の生体組織より効率よく、しかも高収率で単離することが出来る。ここで原料として用いられる哺乳動物の血小板等の生体組織としては、特に限定ではなく、例えばヒト、ウマ、ウン、ブタ、ヒツジ、ウサギ、マウス、ラットなどに由来する血小板等の生体組織のいずれをも使用することができる。これらの血小板等の生体組織は、その起源とする哺乳動物より、常法に従い分離される。

本発明 HGF (1) は、上記により分離された血小板等の生体組織のホモジネートを精製すること

により単離される。HGF (1) の精製は、該 HGF (1) の物理的、化学的、免疫学的性質を利用した各種分離手段の組み合せにより実施することができる。特に好ましい精製手段の一例としては、塩析法及びイオン交換クロマトグラフィー、抗体アフィニティーコロマトグラフィー、色素アフィニティーコロマトグラフィー、レクチンアフィニティーコロマトグラフィー、ゲル遮過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ペルシンアフィニティーコロマトグラフィーを組み合せた方法を例示できる。塩析には硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩を使用することができる。また該イオン交換クロマトグラフィーに用いられる担体としては、タンパク質分離のために用いられている通常の各種イオン交換クロマトグラフィー用の担体を、いずれも用いることができる。その具体例としては、CM-セルロース、CM-セファロデックス、P-セルロース、CM-トヨバール、SP-トヨバール、モノS、S-セファロース、DEAE-セファロース、DE

AE-セファデックス、C-セファロース等のイオン交換樹脂を例示できる。抗体アフィニティーコロマトグラフィーに用いられる担体としては、例えばアフィゲル、トヨバール、セファロースなどの各種の不溶性担体に、抗体を共有結合により不溶化させた担体であれば、いずれも使用できる。

上記精製手段により精製された本発明の HGF (1) は、通常のタンパク質の純度検定手段、例えば SDS-PAGE、逆相高速液体クロマトグラフィーなどにより、均一な単品であることが確認される。

〔実施例〕

以下に参考例及び実施例を示し、本発明をより具体的に述べるが、本発明はこれに限定されるものではない。

参考例 1

(HGF 活性の測定その 1): hakamura, T., et al.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80, 7229-7233
(1983).

ウイスラー系雄ラット(180~200g)を用い、in situ コラーゲン液流法 (Tanaka, Y., et al., J.

Biochem. (TOKYO) 84, 937~946(1978)、中村敏一、初代培養肝細胞実験法、学会出版センター pp 5~53(1987)) により肝実質細胞を分離、精製した。この肝実質細胞を 5%牛血清及び 10^{-8} M インスリンを添加したウイリアムス E 培地(フロー・ラボラトリー社製)に懸濁させ、ウェルマルチプレート(リンプロン社製)に 3.3×10^4 個/ウェルの低濃度でまき込み、5%炭酸ガス及び30%酸素ガスの存在下で培養した。培養 4 時間後、培地を 10^{-8} M デキサメサゾンを含む無血清ウイリアムス E 培地に交換した。20 時間後、さらに同一培地交換及び所定量の被験試料(本発明 HGF (1) 又は他の各種増殖因子)の添加を行った。12 時間後、 3 H-チミジンの $2.5 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ ($54.205/\text{m mol}$) を添加し、さらに 24 時間培養した。尚上記 3 H-チミジンによるラベルの 15 分前に、アフィティコリンの $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ を添加した群をコントロール群とした。上記 24 時間の培養によるラベル後、細胞を PBS で洗い、希 10% トリクロル酢酸(TCA) 水溶液で固定した。細胞を 1 ウェル当たり 0.5 ml の 1N-水酸化ナ

トリウム水溶液で可溶化し、一部をとってタンパク質をローリー法に従って測定した。致死に $10\mu\text{Ci}$ を $20\mu\text{Ci}$ になるように添加し、TCA不溶性画分を達心分離により集め、5% TCA水溶液で洗浄後 $10\mu\text{Ci}$ TCA水溶液 (1%) を加え、90度で 15 分間煮沸し、上清画分の放射能をトルエン-ニタノール系シンチレーターにより測定した。被験試料により成熟肝実質細胞に取り込まれた ^{35}S チミジン量を、コントロールとのカウントの差として求め、これを成熟肝実質細胞 1 mg タンパク質当たりに換算して、DNA合成活性 (dpm/mg タンパク) とし、これを被験試料の HGF 活性の指標とした。尚、HGF 活性を単位 (U) で示す場合は、同一試験において HGF $20\text{ng}/\text{ml}$ を用いた場合の DNA 合成活性 (EGF は該用量で最大活性を示す) の 50% に相当する活性を 1 単位として定義する。

参考例 2

(HGF 活性の測定その 2)

HGF 活性は、また、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80, 7229 (1983) に記載の方法に順じて次のよう

19

試料の一部をとってローリー法 (J. Biol. Chem., 193, 265, 1951) に従い蛋白量を測定した。被験試料を添加したとき肝実質細胞に取り込まれた ^{35}S の量をコントロールとのカウントの差として求め、これをラット肝実質細胞蛋白質 1 mg 当たりに換算して、DNA 合成活性 (cpm/mg 蛋白質) とした。被験試料の HGF 活性は、同一試験において上皮細胞成長因子 (EGF) $10\text{ng}/\text{ml}$ を用いた時の肝実質細胞の DNA 合成活性の 50% に相当する活性を 1 単位と定義して表示した。

参考例 3

(抗 HGF (I) 抗体カラム作成法)

B 構造末端 20 個、即ち V-V-N-G-I-P-T-Q-T-T-V-G-W-M-V-S-L-K-Y-R よりなる合成ペプチド (HGF (I)-L20) は、ペプチド合成装置 (A B 社 430A型) を用いて、フェニルアセトアジメチル (PAM) リンカーを有するレジン (A B 社製) 上で合成した。固相からの合成ペプチドの切断は、トリフルオロメタンスルホン酸 (TFA) 沈淀により行い、得

た粗品を 10mM リン酸水溶液で可溶化し、その放射能をガムカウンターにより測定した。また、ウイスター系ラットからコラーゲン還流液によって肝実質細胞を分離精製した。得られたラット肝実質細胞を 3% チムジン、 2×10^{-4} メイクスリンおよび 2×10^{-4} デキサメサゾンを添加したウイリアムス E 培地 (フローラホラドリー社) に懸濁し、 24h エルマルチプレートに 1.25×10^3 個/ウェルの濃度で播いた。 5% CO₂ および 30h 0, および 05h t, の存在下、37度で 20 時間培養後、 0.1mM のアブロチニンを添加したウイリアムス E 培地に交換すると同時に所定量の被験試料を添加した。15 時間後、 $15\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^{125}I デオキシウリジン $10\mu\text{M}$ /ウェルを添加した。コントロール群には、 ^{125}I デオキシウリジン濃度の 15 分前に $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のアフィディコリンを添加した。さらに 6 時間培養した ^{125}I デラベルした。細胞を pH 7.4 の PBS で 2 回洗浄後、冷 10mM リン酸水溶液 (TCA) で固定した。細胞を 1ml ウエル当り 0.5ml の 1M 水酸化ナトリウム水溶液で可溶化し、その放射能をガムカウンターにより測定した。また放射能測定後の

20

られた粗合成ペプチドを、逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製した。次に水溶性カルボジイミドを用いた Y. IKEDA らの方法 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 107, 656~662 (1982)) に従い、該 HGF (I)-L20 とキーホールリンベットヘモニアニン (KLH) を結合させ、HGF (I)-L20-KLH を抗原として、常法に従いウサギ皮下に $100\mu\text{g}$ 実 2 週間おきに 3 回免疫した。3 回投与 2 週間後に全採血し、抗血清を得て、該抗血清をプロティン A-セファロースカラムに負荷し、 0.1M グリシン塩酸緩衝液 pH 2.0 で溶出される画分を、IgG 画分として精製した。統いて、この IgG 画分を KLH-セファロースカラムにかけ、抗 KLH 抗体を吸着し、抗 HGF (I)-L20 抗体を得た。常法に従い、プロムシマジン (CNS+) 活性セファロース CL-4B 樹脂 (フタルマシア基製) に抗 HGF (I)-L20 抗体を結合させ、抗 HGF (I) 抗体カラムを作成した。

実施例 1

① 血小板抽出液の調整：

1200匹のラット (200~400g) から採取した血液

21

22

を遠心分離(25000×15分)して血小板を沈殿として得た。血小板沈殿を500mlの0.5M PMSFを含む PBS/トリス塩酸緩衝化生理食塩水(pH 7.0)に懸濁させ、オリトロシンキモジナイサー(ダイアル7)で5分間ホモジナイズした。ホモジナートは24,000×gで30分間の遠心分離を行い、上清を得た。

上清液のHGF活性(参考例1)の方法で測定した)は100μg/瓶の添加量で 2.4×10^4 cpm/ng肝細胞タンパクであった。全活性は136,000ユニット、比活性は33.3u/mgタンパク質であった。

② 上記①で得た上清液に硫酸アンモニウムを80%飽和になるように添加して、4℃で一夜放置後、24,000×g、30分間の遠心分離を行い沈殿を得た。沈殿を緩衝液A(50mM Tris-HCl(pH 6.5)、0.15M NaCl、10mM Hepes、2mM CaCl₂)300mlに溶解させ、同一緩衝液で一夜透析した。透析後24,000×g、30分間の遠心分離を行い、不溶物を除去し、上清を得た。

③ 得られた遠心上清を緩衝液Aで充分平衡化したS-セファロースFast Flowカラム(2.6×30cm

フタルマント柱)に30ml/hの流速でかけた。緩衝液Aでカラムをよく洗浄し、HGF(1)から1分下にまで低下したところで0.15から1M NaClの直線濃度勾配でHGF(1)を溶出した。溶出のさいの流速は35ml/hで、フラクションE₁のサイズで集めた。その結果を第2図に示す。区において縦軸(1)は280nmにおける吸光度(A 280)を(2)はHGF(1)活性(参考例1)の方法で測定した)を、また(3)はNaCl濃度を各自示し、横軸はフラクションNoを示す。該図よりHGFは約0.68MのNaCl濃度(フラクションNo 34~40)に溶出された。

④ 上記のフラクションNo 34~40の画分を50mM Tris塩酸緩衝液(pH 7.0)にて3倍希釈し、0.15M NaClを含む10mM Tris塩酸緩衝液(pH 7.4)で平衡化した抗HGF(1)-L20抗体セファロースCL-4Bカラム(ヘッドボリューム1ml)に負荷、0.5M-NaCl含有10mMグリシン-塩酸緩衝液(pH 4.0)で洗浄後8M尿素を含む10mM Tris塩酸緩衝液(pH 7.4)で溶出を行った。結果を第3図に示す。区において、縦軸(1)は280nmにおける吸光度

23

24

(A280)を、(2)はHGF(1)活性(参考例1)の方法で測定した)、横軸はフラクションNoを示す。該図よりフラクションNo 8~12にHGF(1)を得た。

⑤ 上記②~④の精製工程の結果を下記第1表に示す。

第1表

| 精製工程 | ①で得たHGF | ③で得たHGF | ④で得たHGF |
|------------|---------|---------|---------|
| タンパク質(mg) | 4.080 | 17.3 | 0.06 |
| 純HGF活性(U) | 136,000 | 32,950 | 24,100 |
| (U/mgタンパク) | 33.3 | 1,904 | 301,500 |
| 精製度 | 1 | 57 | 9,054 |
| 回収率(%) | 100 | 25 | 18 |

⑥ また上記④の工程で得られたHGF(1)の肝実質細胞増殖に与える効果(HGF(1)活性)の用量依存効果を下記第2表に示す。

(本頁以下余白)

第2表

| 被験資料 | 添加量 | DNK合成活性(cpm/mg細胞タンパク) |
|---------|-----------|-----------------------|
| 無添加 | | 0.7×10^4 |
| ④で得たHGF | 2.5ng/ml | 3.8×10^4 |
| | 5.0ng/ml | 5.9×10^4 |
| | 10.0ng/ml | 8.0×10^4 |

⑦ SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

12.5%アクリルアミドを用い、ラメリラの方法(Lamelli et al., Nature, 277, 680~685(1970))に従って、上記④で得たHGFのSDS-PAGEを行った。泳動後、ゲルを10%メタノール10%酢酸で90分間固定し、10%エタノール-5%酢酸で洗浄後、銀染色を行った。HGF(1)は、唯一のバンドとして染色され、その相対移動度より約80KDの分子量を有すると推定された。また還元SDS-PAGEは試料に2メルカプトエタノール(2ME)を5%加えて、非還元SDS-PAGEと同様の方法にて実施した。非還元で約80KDの分子量を有するHGF(1)は、2本のバンドとして検

25

26

出され、それらの相対移動度より、それぞれの分子量は、約50KD(α鎖)と約32KD(β鎖)であることが推定された(第4図)。

④アミノ酸分析および末端アミノ酸配列の決定

上記④で得たHGF(1)画分にソウイーン20及び堿化ナトリウムを、濃縮最終濃度をそれぞれ0.17及び0.27となるように加えて、遠心濃縮器(トミー精工社製)にて濃縮した。濃縮HGFを、A.Johanssonらの方法(EBRC, 164, 66(1982))を一部変更して、還元アルキル化した。すなわちHGFを4M-グアニジン塩酸を含む0.5Mトリス塩酸緩衝液pH 8.0で60°C、30分処理した後、最終濃度20 mMとなるようにジチオスルイドを加えて窒素置換して、暗所室温で2時間還元反応を行った。ついで最終濃度40mMとなるようにヨードアセチルミドを加えて窒素置換した後、暗所室温で1時間アルキル化反応を行った。得られた還元アルキル化HGF(1)はBio-Pore 304(Bio-Rad社製、C₁₈)カラムを用いた逆相裏逆液体クロマトグラフィー

で分離した。溶出は、30mM NaCl 及び0.1% SDS存在下にてアセトニトリル濃度を40%から50%迄直線的に上昇させて行った。第5図に、得られた溶出パターンを示す。図において、横軸は280 nmにおける吸光度(1)、(2)はアセトニトリル濃度を、横軸はフラクションNを示す。図に示す如く、アルキル化HGF(1)はピーカーIとピーカーIIに分離され、既項のSDS-PAGE法により、ピーカーIは分子量約50KDのα鎖、ピーカーIIは分子量約32KDのβ鎖であることを確認した。上記のHGF(1) α鎖画分およびHGF(1) β鎖画分を0.1N-HClで110°C、24時間加水分解後、アミノ酸自動分析装置(日立製 E35型)を用いてアミノ酸分析を行った。その結果は前記した通りである。上記方法で得られたHGF(1) β鎖画分 300pmoleをペブチドシーカンサー(アプライドバイオシステム社 477A型)を用いて30サイクル解析して、HGF(1) β鎖のN末端側アミノ酸配列を決定した。β鎖N末端側27個のアミノ酸配列は、V-V-N-C-I-P-T-Q-T-T-V-S-W

27

-M-V-S-L-K-Y-R-N-K-H-I-C-G-Cであった。

実施例2

①肝抽出液の調製

ラット(系統SD: 体重200~300g) 100匹の腹腔内にサラダ油に溶解した20%四塩化炭素溶液を10mL/kg投与し(四塩化炭素として2mL/kg投与)、30時間後に肝臓を摘出した。摘出した肝臓は0.15M NaCl、1mM PMSF、1mM モノヨード酢酸、1mM EDTAを含む緩衝液B(50mM Tris-HCl(pH 8.5)、10mM Hepes、2mM CaCl₂、0.01% Tween 80)4L中でワーリングブレンダーで破砕した。破碎後、冷却遠心機(日立 20PR-52)で10,000回転/分の遠心を行い、沈殿物を除いた。上澄を滤紙で通過し、滤液を肝抽出液として得た。②陽イオン交換クロマトグラフィー

肝抽出液約4Lを約4倍容の0.15M NaClを含む緩衝液Bに2時間以上を3回透析した後、0.15M NaClを含む緩衝液Bで平衡化したS-セファロースFF(ファルマシア社製)のカラム(サイズ: 内

28

径11.3cm×高さ10cm)に添加した。

0.15M NaClを含む緩衝液で洗浄後、0.15Mから1.0MのNaClの直線濃度勾配(全量6L)により溶出した。溶出画分を参考例2に示した方法によりHGF活性を測定し、活性画分を集め S-セファロースFF溶出液とした。第6図にその溶出パターンを示す。

③色素アフィニティーコロマトグラフィー

S-セファロースFF溶出液を1N HClでpH 7.5に調製後、同量の0.01% Tween 80を含む蒸留水で希釈し、緩衝液C(20mM Tris-HCl(pH 7.5)、0.01% Tween 80)で平衡化したBlue-Trisacryl Mカラム(1BF社製、カラムサイズ: 内径: 2.6 cm×高さ13.5cm)に添加した。緩衝液Cで洗浄後、0から0.5Mのアルギニンの直線濃度勾配(全量350mL)により溶出した。溶出パターンを第7図に示す。

HGF活性の高い画分を集めBlue-Trisacryl M溶出液とした。

④ヘパリンアフィニティーコロマトグラフィー

29

30

Butyl Trisacryl M 浸出液を 2 例の柱洗浄液 (0.02M Tris-HCl (pH 7.5)、0.01% Tween 80) で洗浄した後、0.3M NaCl を含む緩衝液にて平衡化したヘパリンセファロース CL-65カラム (ファルマシア社製、カラムサイズ: 内径 1.6cm × 高さ 7.5cm) に添加した。0.3M NaCl を含む緩衝液にて洗浄後、0.3M から 2.0M NaCl で線形濃度勾配 (全量 150ml) により溶出した。溶出パターンを第 8 図に示す。HGF 活性の高い部分を含むヘパリン・セファロース溶出液とした。

⑤ 酸性クロマトグラフィー

溶媒 A (20mM リン酸緩衝液 (pH 7.5)、4M NaCl) と溶媒 B (20mM リン酸緩衝液 (pH 7.5)、50% エチレンジリコール) の 2 : 1 混液により平衡化されたフェニル-5PH カラム (東ソー社製、カラムサイズ: 内径 7.5mm × 高さ 7.5cm) にヘパリン・セファロース溶出液を添加した。溶出は溶媒 A と B の組成比を 2 : 1 から 0 : 1 に連続的に変えることにより行った。その溶出パターンを第 9 図に示す。45 分前後に溶出した HGF 活性を示す箇

分を茎の精製 HGF (1)を得た。尚、85 分前後に溶出した HGF 活性部分は HGF (E) であった。

⑥ SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

実施例 1 の色の項に示した方法に従い、本実施例の色項及び色項で得られたヘパリン・セファロース溶出液と精製 HGF (1) の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行った。結果を第 10 図に示す。

ヘパリン・セファロース溶出液は、非還元条件下約 80KD の第一バンドを示した。しかし、還元条件下では約 50KD、約 60KD と約 32KD の 3 本のバンドを示し、2 本類型 HGF (1) と本類型 HGF (E) の存在を示した。一方、精製 HGF (1) は非還元条件下と同じ約 80KD の第一バンドを、還元条件下約 60KD (A 級) と約 32KD (B 級) の 2 本のバンドを示し、酸性クロマトグラフィーにより HGF (1) が均一に単離されたことを示した。

⑦ 本実施例での②～⑥の精製工程の結果を下記第 3 表に示す。尚、本実施例での HGF 活性は参考例 2 に示した HGF 活性測定法 (その 2) に従っ

3-1

3-2

て行った。

第 3 表 肝抽出液からの HGF (1) 精製工程

| 精製工程 | タンパク質 (mg) | 純 HGF 活性 (U) | 精製度 | 回収率 (%) |
|----------------------|---------------|-----------------|------|------------|
| S-typD-2 | 303 | 31,900 | 1 | 100 |
| Butyl Trisacryl M | 33.4 | 22,100 | 6 | 69 |
| ヘパリンセファロース | 0.173 | 15,200 | 641 | 48 |
| Phenyl-5PH | 0.009 | 5,100 | 5480 | 16 |

⑧ N 末端アミノ酸配列の決定

本実施例の⑥で得られた精製 HGF (1) の N 末端アミノ酸配列を、実施例 1 の色項に示した方法に従い、決定した。即ち、精製 HGF (1) を還元アルキル化後、C. 逆相 HPLC により A 級と B 級に分離し、ペブチドシーキエンサーにより N 末端のアミノ酸配列を決定した。B 級 N 末端の 13 個のアミノ酸配列は V-V-N-C-I-P-T-Q-T-T-V-C-W と決定され、血小板ホモジネート由来の HGF (1) アミノ酸配列と一致した。

実施例 3

① ヒト胎盤抽出液の調製

ヒト胎盤 (1 個約 500g を 5 個) の皮をはぎとり、ナイフとハサミで組織を細かく切断したのち、10L の緩衝液 E (0.02M Tris-HCl (pH 8.5)、0.1M NaCl、0.01% Tween 80) を加え、ワーリングブレンダーでホモゲナイズした。いったん低速遠心分離 (600g × 5 分間) により、大きな組織断片を除いた後、上清を再度高速遠心分離 (10,000g × 20 分間) にかけた。上清液をとり、沈まなかった粒子や脂肪をガーゼでこしとった後、緩衝液 E で平衡化しておいた DEAE-セファクリル (チッソ社製、湿重量 200g) を加え、4℃にて 1 夜搅拌させた。樹脂を濾別し、緩衝液 E でくり返し十分洗浄し、水分を切った後、1.5M の NaCl を含む緩衝液 E 1L に投入し、約 2 時間搅拌して吸着物を樹脂より溶離させた。錯過して得た溶離液を緩衝液 F (0.02M Tris-HCl (pH 7.5)、0.3M NaCl、0.01% Tween 80) に対し、外液 10 倍量で 3 回透析し、胎盤抽出液を調製した。

3-3

3-4

②ヘパリンセファロースクロマトグラフィー

②項で得た胎盤抽出液を緩衝液Fで平衡化したヘパリン・セファロース CL-65カラム(ファルマシア社製、カラムサイズ: 直径 2.6cm × 高さ 20cm)に流速 200ml/分時間でかけた。緩衝液Fにて非吸着物質を十分流し出した後、0.3Mから2.0M NaCl の直線濃度勾配溶出により、HGF活性物質を溶出させた。このヘパリンセファロースクロマトグラフィーの溶出パターンを第11図に示す。HGF活性は約1.0M NaCl付近に溶出され、その部分を集めヘパリン・セファロース溶出部分を得た。

③コンカナバリンAセファロースクロマトグラフィー

あらかじめ緩衝液C (0.02M Tris-HCl(pH 7.5)、0.5M NaCl、0.01% Tween 80)で平衡化させておいたコンカナバリンAセファロースカラム(ファルマシア社製、カラムサイズ: 直径 1.6cm × 高さ 5.0cm)にヘパリン・セファロース溶出部分を添加した。緩衝液Cで洗浄後、Cから0.5Mのメチル-α-D-グルコシドを含む緩衝液Cにより、直線濃度勾配溶出を行った。流速は20ml/分時間で行っ

3.5

た。HGF活性は45,000倍に上昇した。尚、本実施例でのHGF活性測定は参考例2に示したHGF活性測定法(その2)に従って行った。

④ SDS-PAGEアクリラミド電気泳動

実施例1の④の項で述べた方法により、本実施例の③項及び④項で得られたコンカナバリンAセファロース溶出部分と精製HGF(1)部分のSDS-PAGEを行った。結果を第14図に示す。実施例1及び2と同様コンカナバリンAセファロース溶出部分には2本類型HGF(1)と1本類型HGF(2)が存在し、疎水性HPLCによりHGF(1)が均質に単離されたことが示された。

⑤N末端アミノ酸配列の決定

本実施例の④の項で得られた精製HGF(1)のN末端アミノ酸配列を実施例1の⑤項に述べた方法と同じ方法により決定した。即ち、精製HGF(1)を還元アルキル化後、C、逆相クロマトグラフィーにより分子量約50KDのα鎖と約32KDのβ鎖とを分離し、ペブチドシーケンサーによりN末端アミノ酸配列を決定した。β鎖N末端の18個のアミ

ノ酸配列が決定され、その配列は、V-V-N-G-I-P-T-R-T-N-I-C-W-M-V-S-L-R-Vであった。

⑥疎水性クロマトグラフィー

最終精製工程は疎水性クロマトグラフィーの1つであるフェニル 5PK HPLC(東ソー社製、カラムサイズ: 直径 0.75cm × 高さ 1.5cm)によって行った。溶媒C (0.02M リン酸緩衝液(pH 7.5)、4M NaCl) と溶媒D (0.02M リン酸緩衝液(pH 7.5)、50%エチレンギリコール) の2:1混液でフェニル 5PKカラムを平衡化した後、コンカナバリンAセファロースカラム溶出部分を添加した。その後、溶媒CとDの組成比を2:1からC:Dに連続的に変化させることにより溶出を行った。流速は0.5ml/分で行った。フェニル 5PK HPLCの溶出パターンを第13図に示す。保持時間45分前後に溶出したHGF活性部分を集め精製HGF(1)部分を得た。

収量はヒト胎盤5個より約15mlとの精製HGF(1)が得られた。全工程の収率は約20%で、生活性

3.6

N末端アミノ酸配列が決定され、その配列は、V-V-N-G-I-P-T-R-T-N-I-C-W-M-V-S-L-R-Vであった。

〔発明の効果〕

本発明によれば、成熟肝実質細胞の生体外での増殖を可能とする二種のサブユニットからなる成熟肝実質細胞増殖因子(1)が提供される。

4. 図面の簡単な説明

第1図は非還元HGF及び還元アルキル化HGFのHi-Pore 304 (C. 逆相) HPLCの溶出パターンとSDS-PAGE移動図、第2図は塩析再溶解液のS-セファロースFF-FPLCの溶出パターン、第3図はS-セファロースFF-FPLC処理液のHGF(1)・L20抗体カラムの溶出パターン、第4図は精製HGF(1)のSDS-PAGE移動図、第5図は還元アルキル化HGF(1)のHi-Pore 304 (C. 逆相) カラムの溶出パターン、第6図は肝抽出液のS-セファロースFFクロマトグラフィーの溶出パターン、第7図は肝抽出液の色素アフニティーコロマトグラフィーの溶出

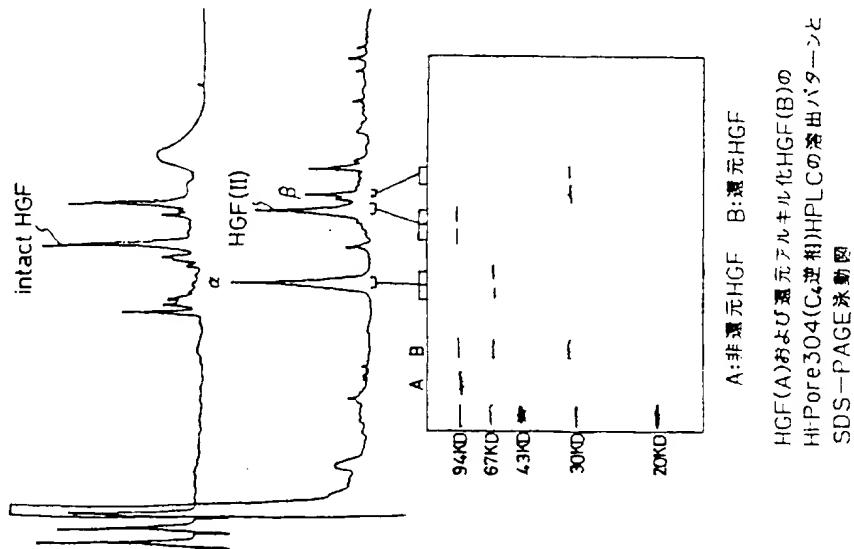
3.7

-1838-

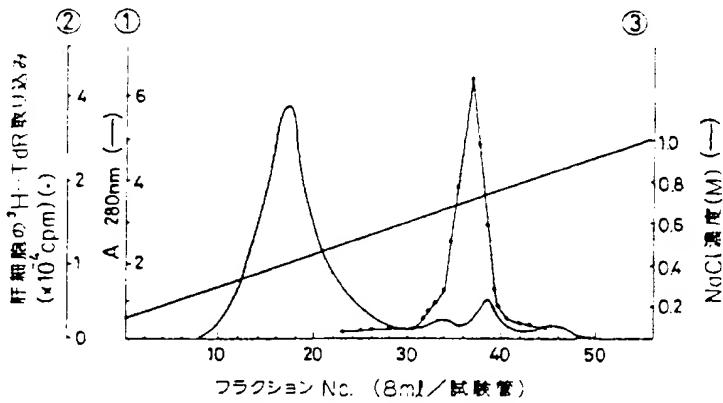
3.8

バターン、第8図は肝抽出液のヘパリン・セファロースクロマトグラフィーの溶出バターン、第9図は肝抽出液のフェニル SEP-HE PAGE による溶出バターン、第10図は肝抽出液から精製した HGF SDS-PAGE、第11図は胎盤抽出液のヘパリン・セファロースクロマトグラフィーの溶出バターン、第12図は胎盤抽出液のコンカナハリノA・セファロースクロマトグラフィーの溶出バターン、第13図は胎盤抽出液のフェニル SEP-HPLC の溶出バターン及び第14図は胎盤抽出液から精製した HGF の SDS-PAGE の図である。

出願人 東洋紡織株式会社
代理人 井理士 平木祐輔
同 井理士 石井貞美

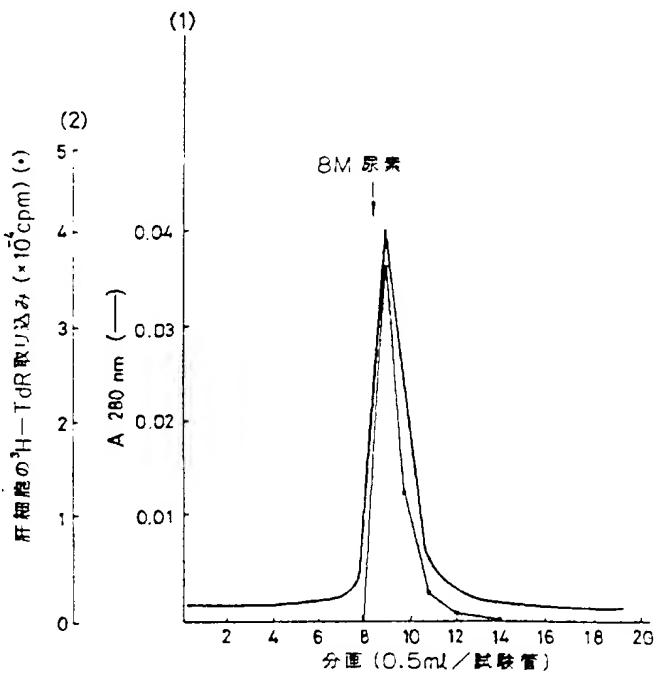


第1図



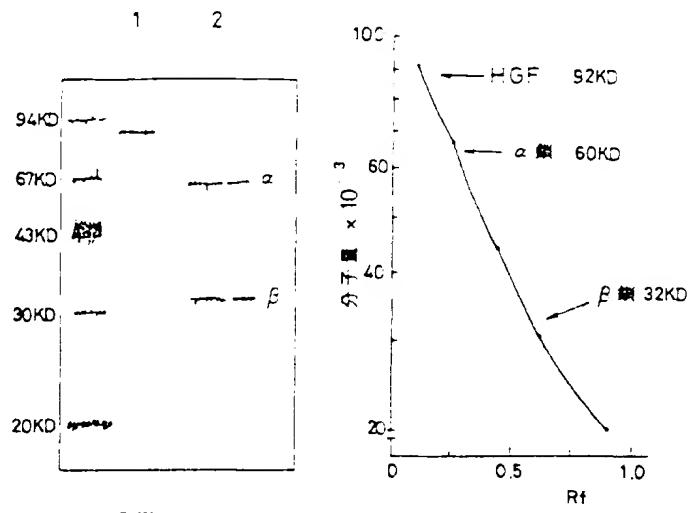
解析再溶解液のS-セファニース FF FPLCの溶出パターン

第2図



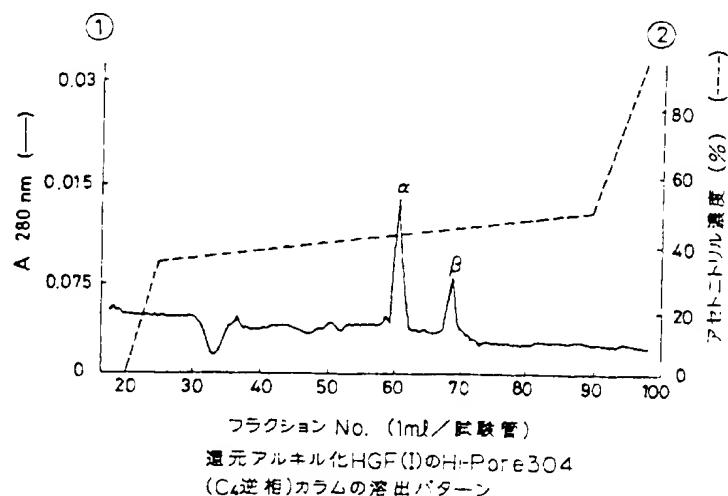
S-セファコースFF FPLC処理液のHGF(I)
L20抗体カラムの溶出パターン

第3図



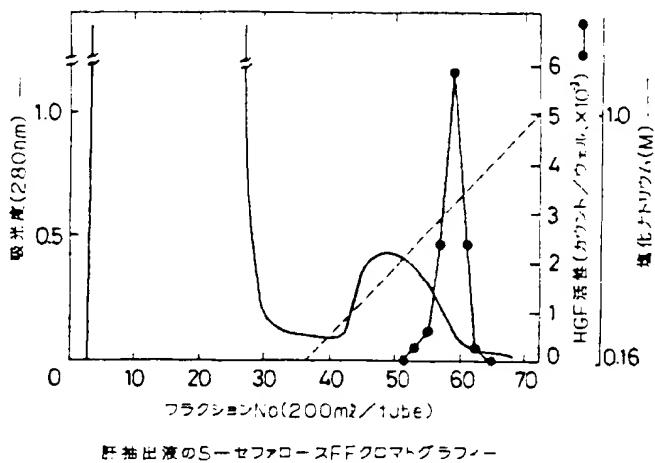
精製HGF(I)のSDS-PAGE
(+ 2メルカプトエタノール)
1.非還元 2.還元

第4図



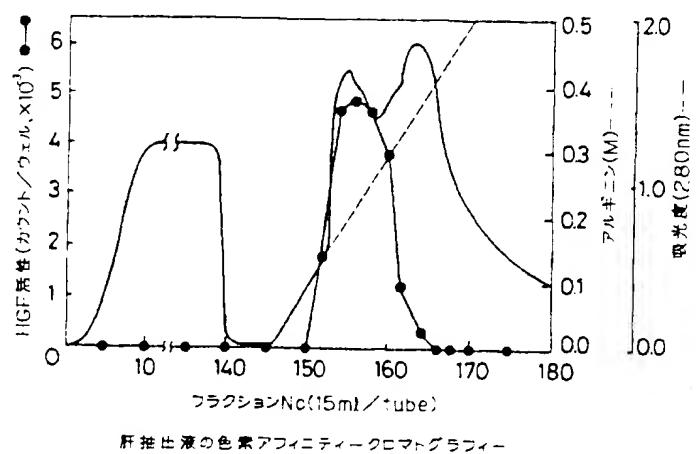
第5図

第 6 図



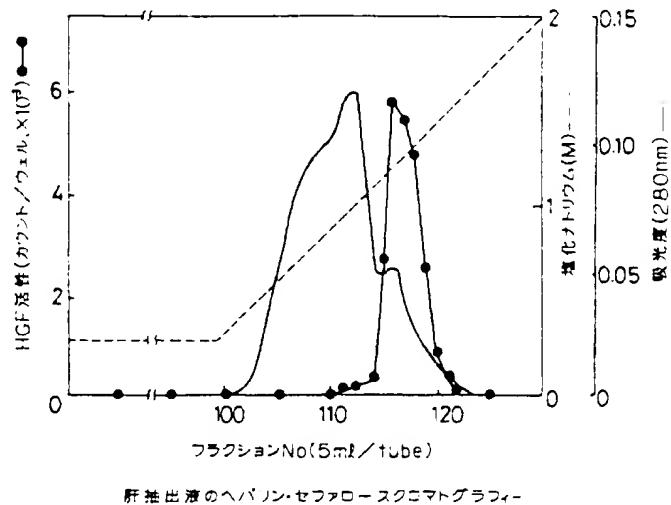
肝抽出液のS-100 SFFクロマトグラフィー

第 7 図



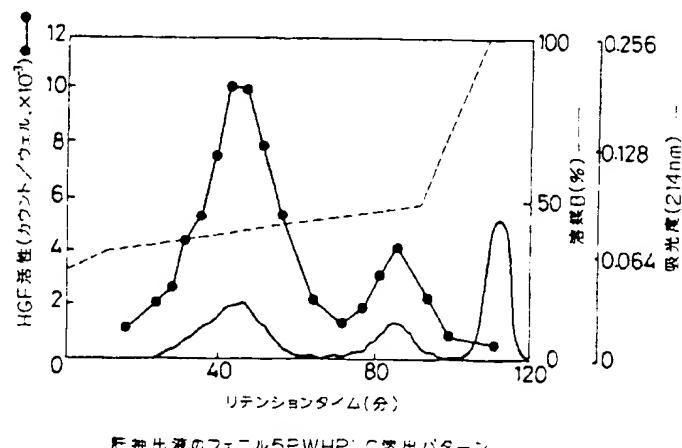
肝抽出液の色素アフィニティクロマトグラフィー

第 8 図



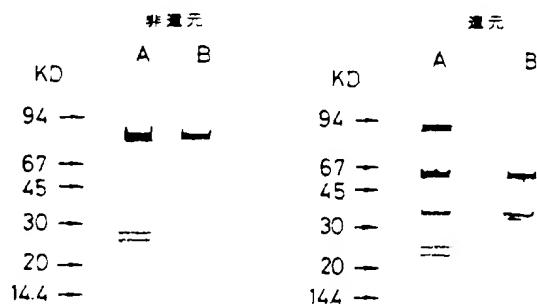
肝抽出液のヘパリン・セファロースクニマトグラフィー

第 9 図



肝抽出液のフェニルSPWHP LC溶出パターン

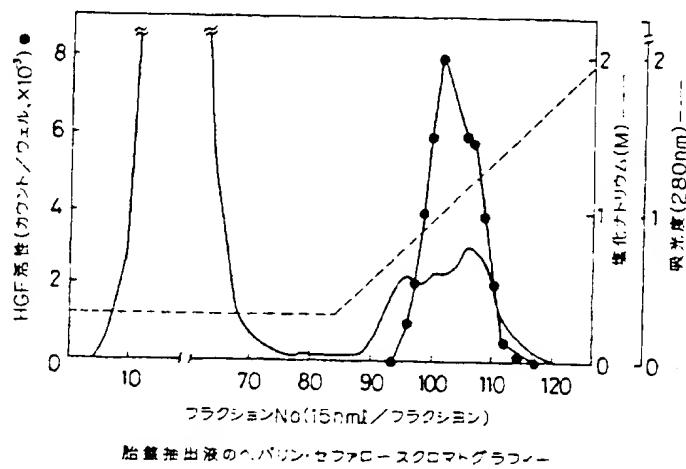
第 10 図



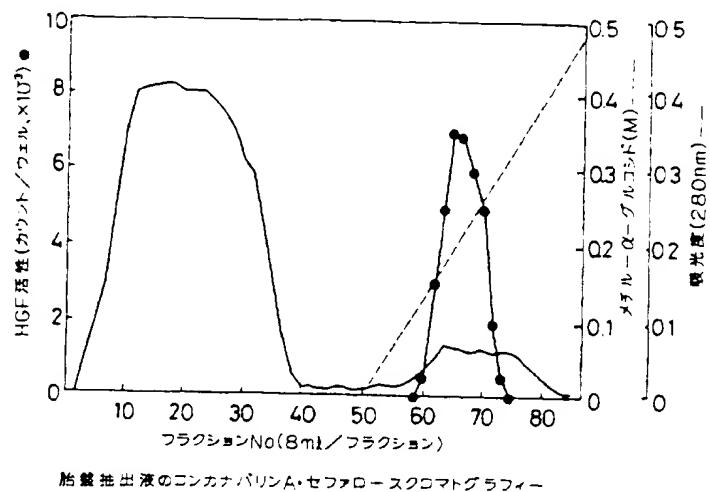
肝抽出液から精製したHGFのSDS-PAGE

A. ヘパリン・セファロース溶出HGF画分
B. フェニル5PWHPLC精製HGF(i)

第 11 図

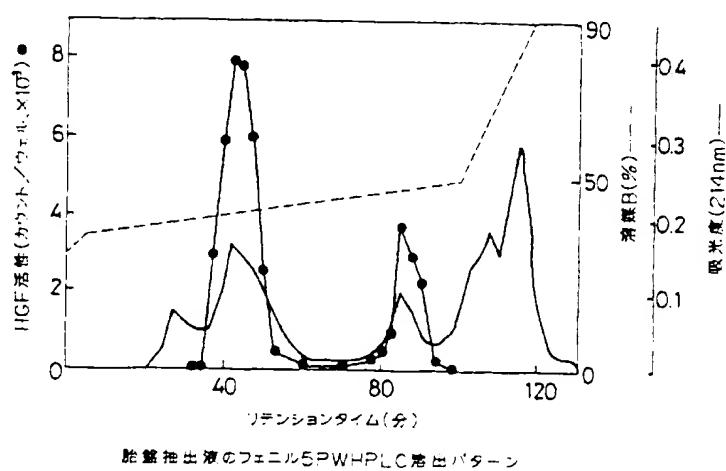


第 12 図



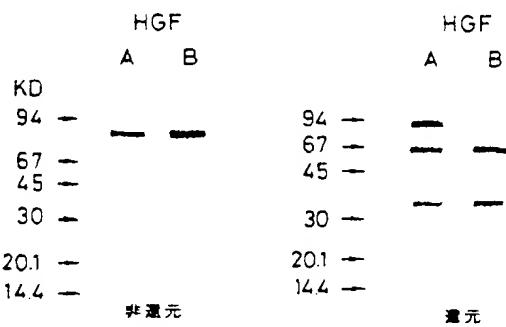
胎盤抽出液のニンカナパリンA・セファロースクロマトグラフィー

第 13 図



胎盤抽出液のフェニル5PWHPLC流出パターン

第 14 図



胎盤抽出液から精製したHGFのSDS-PAGE

A. コンカナバリンA・セファロース漏出HGF画分

B. フニニルSephadex G-200精製HGF(i)